

Az istállótrágya enzimes szaharozbontásának vizsgálata

I. A pH és a hőmérséklet hatása az enzimaktivitásra

SZOLNOKI JÁNOS

Magyar Tudományos Akadémia Talajbiológiai Kutató Laboratóriuma, Sopron

Az utóbbi időben gyakran találkozunk a nemzetközi tudományos irodalomban olyan tanulmányokkal, melyek az egyes biotopok (főleg talajok) enzimaktivitásának vizsgálata segítségével próbálják az ilyen biotopokban végbemenő mikrobiális tevékenységet tanulmányozni.

F e r m i [4] már 1910-ben megkísérelte, hogy a különböző talajokból kivont enzimek mennyiségéből következtessen a talajokban végbemenő tevékenységre. Elgondolásai alapjukban helyesek voltak, de megfelelő eredményeket nem kaphatott, mivel az általa extrahált enzimmennyiség nem volt alkalmas a mérések elvégzésére. A későbbiek során megkísérelték a kérdést különféle enzimek aktivitásának meghatározása segítségével megközelíteni. Az utóbbi időben többen vizsgálták a talajok szaharázaktivitását [6, 7, 10, 22, 23]. Nálunk K r o l l és munkatársai [14, 15, 16] foglalkoztak talajok és részben trágyák enzimaktivitásának vizsgálatával. M á r k u s n é [20] módszert dolgozott ki a talajok és trágyák cellulázaktivitásának mérésére.

Az enzimaktivitási vizsgálatok nagyban hozzájárultak a kérdéses biotópok biológiai aktivitásának és a bennük lejátszódó biokémiai folyamatoknak a tisztázásához. Egyes szerzők azonban az enzimaktivitási vizsgálatokból olyan következtetésekre jutottak, melyeket nem lehet teljesen elfogadni és beigazolni tekinteni. Így H o f m a n n és S e e g e r e r [10, 11] egyenesen a talajok enzimaktivitása és termőképessége között vélnek összefüggéseket felfedezni. M a s t a k o v és társai [21] a talajlégzés intenzitásával jellemezhető mikrobiológiai folyamatok élénksége és a talajenzimek aktivitása mértékéből következtetnek a talaj termőképességére. Kétségtelen, hogy az enzimaktivitás nagyon jelentős és értékes faktor a talajok tanulmányozásánál. Nyilvánvaló azonban, hogy a talaj termőképességét az enzimaktivitáson kívül számos egyéb tényező jellemzi és befolyásolja. D r o b n i k és S e i f e r t [2] vizsgálatai is azt mutatják, hogy nem állapítható meg összefüggés a talajok szaharázaktivitása, a CO₂ termelés, a mikroorganizmusok száma és a talajtermékenység között.

Trágyabiológiai szempontból ezideig alig folytattak vizsgálatokat ebben az irányban, noha az enzimek nyilvánvalóan nem elhanyagolható hatást fejtenek ki az erjedés során az istállótrágya anyagaira. Valószínű, hogy különösen jelentős ez a hatás az erjedés kezdeti szakaszán, amikor számos szerző adatai szerint az anyagvesztés viszonylag a legnagyobb. Figyelemre méltó szempont az is, hogy az istállótrágya olyan biotop, melyben mind térbelileg, mind pedig időben meglehetősen szűk keretek között eléggé jelentős pH és nagyon jelentős hőmérsékleti változások lépnek fel, melyek nem lehetnek közömbösek a mikrobiális élet és így az enzimaktivitás szempontjából sem. Az istállótrágyának, ennek az enzimaktivitás szempontjából is egészen speciális, extrém biotopnak a vizsgálata azzal a reménnyel is

kecsegtet, hogy sikerül néhány általános enzimológiai természetű kérdést is megvilágítani.

Az istállótrágya enzimaktivitásának vizsgálatára alkalmasnak ígérkezett a szaharoz enzimes bontásának vizsgálata, mivel egyrészt nagyon sok szaprofita mikroorganizmus rendelkezik szaharozbontó enzimmal, másrészt ez az enzim meglehetősen állandó és aktivitása könnyen mérhető [7].

Nyilvánvaló, hogy a trágyában, ebben a rendkívül bonyolult összetételű és a mikroorganizmusok számára sokféle tápanyagforrást adó élettérben, mely a legkülönbözőbb mikroorganizmusfélések tevékenységét teszi lehetővé, nem egyféle — izodinamiás — invertáz és talán nem is csak invertáz végzi a nádcukor bontását, hanem más-más mikrobafajok előtérbe lépésekor más és más szaharozbontó enzimfélések működik dominánsan. Talajokra vonatkoztatva számos vizsgálat megerősítette, hogy a nádcukor enzimesen hidrolizálódik [8, 9].

A trágyában levő enzimmészlet három úton kerülhet a vizsgálati anyagba:

1. Feltételezhetjük, hogy az alomnak használt növényi részek útján a trágyába enzimek is juthatnak.

2. Enzim kerülhet a trágyába az állati ürülék útján.

3. Végül a trágya enzimentartalmának legfontosabb forrása lehet a benne élő nagytömegű, enzimekben rendkívül gazdag mikroorganizmus.

A két első út, ahogyan a trágyába enzim kerülhet, az erjedés során folytatott vizsgálatok szempontjából gyakorlatilag nem jön számításba nem csak azért, mert ez a valószínűleg mennyiségileg és így hatáskörben sem jelentős, de azért sem, mert a trágya kazalba rakásakor nagyon hirtelen fellépő igen erős felmelegedés ezeket az alacsonyabb hőmérsékleti optimumú enzimeket minden bizonnyal rövid idő alatt inaktíválja. Marad tehát a mikroorganizmusok enzimmészlete, mely az enzimaktivitási vizsgálatoknál a legfontosabb lehet.

Az enzimaktivitást befolyásoló egyes tényezők

Különbséget kell tennünk az enzim képződését és a már meglevő enzim aktivitását befolyásoló tényezők között. Az előbbit befolyásolják: a) a tápközeg kémiai összetétele, b) a mikrobák növekedésének fizikai és kémiai körülményei, c) a mikrobatenyésztés kora. Ezzel szemben a már meglevő enzimmészlet aktivitását csak a fizikai és kémiai viszonyok, mint a bontandó szubsztrátum töménysége, az esetleges adszorbeálódás, a jelenlevő aktivátorok és inhibitorok, az oxidáció mértéke, a hidrogénionkoncentráció és a hőmérséklet szabályozzák.

Általában, ha valamely enzim aktivitását akarjuk meghatározni, optimális feltételeket igyekszünk teremteni. Erre lehetőség is adódik, ha tiszta enzimpreparátummal van dolgunk. Más a helyzet azonban, ha olyan komplex vizsgálati anyaggal dolgozunk, mint a talaj, vagy a trágya. Ezeknél egész sor ismeretlen inhibitor, aktivátor, vagy esetleg akceptor működhet, továbbá ezeknek rendkívül heterogén mikroflórája számos különféle enzimet termel, melyek egymásra is hatást gyakorolhatnak.

Számolnunk kell azzal a lehetőséggel is, hogy különböző eredetű, de azonos reakciót katalizáló — izodinamiás — enzimekkel van dolgunk, melyek különböző reakcióképesség mellett hatnak a szubsztrátumra, tehát relatív fajlagosságúak. Ezek különböző pH, hőmérséklet, stb. optimummal is rendelkezhetnek. Ilyenek lehetnek a különböző glukozydázok, penész-, élesztőmaltáz, bél-, élesztő-, baktériumszaharáz is. Figyelembe kell vennünk azt is, hogy a nádcukor bontásában nem csupán az invertáz vehet részt, de a tényezőktől függően a maltáz is. A maltáz hatásoptimuma a semleges pont közelében van és az invertáz 4,5 pH optimumánál

teljesen hatástalan, viszont pH 7,0 körül a diszaharidot erőteljesen hidrolizálja. Meglepő, hogy bizonyos körülmények között a maltáz a nádcukrot kétszer olyan gyorsan bontja, mint a maltózt [1].

Lehetséges, hogy a trágyában — különösen magasabb pH értékek mellett — a két enzimhatás, az invertáz és a maltáz bontóhatása összegeződik. Éppen az elmondottak alapján helytelennek kell tartanom talajok és trágya esetében a „szaharáz-aktivitás” kifejezést. Ezért magam a „szaharozbontó enzimaktivitás” kifejezést használom.

A nagyon bonyolult összetételű trágyaanyag vizsgálatánál az optimális feltételek biztosítása meglehetősen körülményes. Mivel pedig nem csak a trágyák potenciális, tehát optimális körülmények között elérhető legmagasabb enzimaktivitását kívánjuk vizsgálni, hanem enzimológiai módszerekkel próbáljuk felderíteni a trágyában végbemenő biológiai tevékenységet, nehézségeink csak fokozódnak. Ugyanis hamis képet kapunk, ha csak az optimális (potenciális) enzimaktivitást vizsgáljuk az enzimre legkedvezőbb pH, hőmérséklet stb. viszonyok között. Feltétlenül ki kell terjesztenünk az aktuális enzimaktivitásra is, mely a vizsgálati anyag saját pH-ján és hőmérsékletén értékelhető. Kroll és Krámer vizsgálatai is igazolják, hogy a talajok foszfatazaktivitása más a talaj saját pH-ján, mint egyéb pH értékeken.

A „potenciális” és „aktuális” kifejezés nem tévesztendő össze a Karström által bevezetett hasonló kifejezésekkel, melyeket ő a mikroorganizmusok enzimes adaptálódásával kapcsolatban használ.

A jelen esetben a ténylegesen meglévő enzimkészlet optimális körülmények között mutatózó (potenciális), vagy a vizsgálati anyag eredeti körülményei között tapasztalható (aktuális) aktivitásáról van szó. Így pl. eltérés mutatkozik a trágya enzimaktivitásban, ha azt az irodalom szerint optimálisnak mondott pH és hőmérsékleti viszonyok között, vagy pedig a trágyakazalban ténylegesen meglévő pH és hőmérsékleti viszonyok között vizsgáljuk.

Gale és Epps [5] is használják a potenciális és tényleges kifejezéseket a közeg pH-jának az enzimtevékenységre gyakorolt befolyására vonatkoztatva. Megkülönböztettek potenciális aktivitást az (enzim aktivitása optimális pH mellett) és tényleges aktivitást (a tenyésztési pH-n mért enzimaktivitás). A potenciális és aktuális enzimaktivitás fogalmát azonban ki kell terjesztenünk a hőmérsékleti faktorra is, mert előfordul, hogy a közeg pH-jában mutatózó különbségek az enzim aktivitásában sokkal kisebb differenciákat okoznak, mint a hőmérsékleti különbségek.

Vizsgálati anyag és módszer

A talaj, illetve trágya enzimaktivitásának vizsgálata lényegében úgy történik, hogy a vizsgálandó anyagot, miután abban a mikrobákat plazmolitikum (toluol, xilol) segítségével elpusztítottuk, puffereljük és szubsztrátummal inkubáljuk, majd a maradék szubsztrátum, esetleg a képződött termék mennyiségéből számítjuk ki az enzimaktivitást. Komplex anyagok vizsgálatánál, amikor tehát nem tisztá enzimpreparátummal van dolgunk (talajok, trágyák), a Hofmann és mások által javasolt eljárást szokták alkalmazni. Vizsgálataimnál én is ezt a módszert követtem.

10 g friss, nedves, illetve 5 g légszáraz trágyát mértem be 100 ml-es mérőlombikba. Adtam hozzá 2,5 ml toluolt és jól összeráztam. 15 perc múlva adtam hozzá 10 ml kellő pH-ra beállított Sørensen-féle $\frac{1}{15}$ mol.-os foszfátpuffert és 10 ml 20%-os nádcukor oldatot. A szükséges hőfokon 23 óra hosszat inkubáltam, majd a lombikot azonos hőfokú vízzel jelig feltöltöttem és felráztam. Egy óra múlva szűrtem. A szűrletből 10 ml-t 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba pipettáztam, adtam hozzá 10 ml Fehling-oldatot és 5 ml vizet. A lombikot 5 percre forró vízfürdőre állítottam, majd

kihűlés után 4 ml 1 : 3 arányú kénsavval meg savanyítottam a tartalmát és adtam hozzá 5 ml 20%-os KJ oldatot. A kivált jódot 0,1 n nátriumtioszulfáttal visszatitáltam. Vak kísérletben a Fehling-oldatra fogyott tioszulfát és a vizsgálati anyagra fogyott tioszulfát közötti ml differencia fejezi ki az enzim aktivitásának mértékét. Az eredményből le kell vonni a cukor nélküli vak vizsgálati anyaggal kapott ml értékeket.

Az eredményeket 10 g 105 C°-on szárított trágyára számítottam át. A vizsgálatokat 2—2 párhuzamossal végeztem, a megadott eredmények középértékek.

Bár talajenzimológiai vizsgálatoknál általában légszáraz anyagot szoktak használni, a trágyavizsgálatok esetében jobbnak láttam, ha főleg friss, nedves trágyával dolgozom. A magas (70—80%) nedvességtartalmú istállótrágya szárítása az enzimkárosodást elkerülendő lehetőleg alacsony hőfokon elvégezve — több napig tart. Tudjuk, hogy még az érett trágyakazal megbontásakor is az addig látens állapotban lévő mikrobák levegőhöz jutva igen nagymértékben elszaporodnak és utóerjedés következik be. A trágyaminták szárításánál is számolnunk kell ezzel a lehetőséggel. Másrészt maga a szárítás is közvetlenül csökkentheti az enzimaktivitást [12, 22]. Egyes esetekben azonban légszáraz trágyával is végeztem vizsgálatokat. Ilyenkor a szárítást vákuumszáritóban 40 C°-on végeztem. A vizsgálatokat részben egészen friss trágyával, részben pedig 4 hónapos erjedésen átesett érett trágyával végeztem.

A pH beállításához foszfátpufferrel használtam. Hofmann ugyan acetátpuffer ajánl, de egyes szerzők megengedhetőnek tartják a foszfátpuffer alkalmazását is. Másrészt ismert a foszfátionok enzimaktiváló hatása. A pufferoldat által történő cukorhidrolízis, mint hibaforrás jelentkezhethet, ezért vak kísérletet is állítottam be (toloul + puffer + cukoroldat).

Korábbi szerzők talajenzimológiai vizsgálataikat 5,5 pH-n végezték. Én a vizsgálataimat egyidejűleg egyéb pH-ra pufferelt anyaggal is elvégeztem.

A talajok szaharázaktivitásának vizsgálatát Seegerer [23] és Kroll [14] 37 C°-os hőmérsékleten, Kuprevics [17] 30 C°-on végezte. Számos irodalmi adat van arra, hogy a különböző eredetű invertázok hőoptimuma 40 C°-nál magasabb. Tekintettel arra, hogy a trágyában a hőmérsékleti viszonyok lényegesen mások, mint a talajban, vizsgálataimnál a 37 C°-os hőmérséklettel párhuzamosan alacsonyabb (25 C°) és magasabb (50—80 C°) hőmérsékleten is inkubáltam.

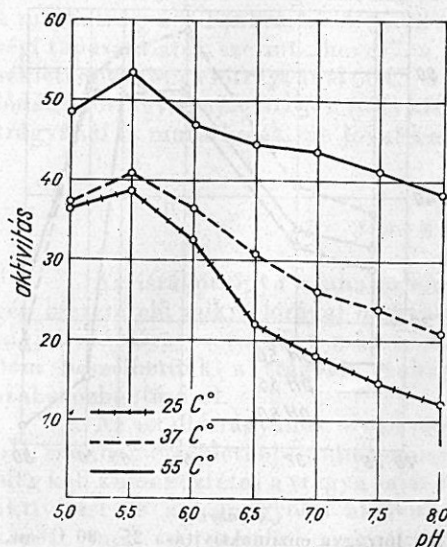
A hidrogénkoncentráció hatása a trágya enzimes szaharozbontására

Scheffer és Twachtman [22] különböző talajok szaharázaktivitásának vizsgálatánál pH-optimumot nem találtak, amit az enzimek különböző eredetével magyaráztak. Seegerer [23] vizsgálatai is azt bizonyítják, hogy az optimum meglehetősen tág (4,7—6,1) pH-értékek között mozog. Hofmann és Seegerer [10] szerint a talajok szaharázaktivitása két pH-optimumot mutat. Az egyik csúcsot a gombák (pH 5,0) a másikat a baktériumok (pH 6,0) által termelt enzim optimumának tartják. Sumner és Myrbäck szerint a szaharázaktivitás pH-optimuma 4—5 között van. Avery és Glen Cullen (idézve Euler [3] nyomán) a *Pneumococcus* szaharáz pH-optimumát 7,0 körülnek mondják. Leibowitz és Mechliniski [18] azt találta, hogy a takaszaharáz pH-optimuma kb. 6,0, Josephson [13] szerint az *Aspergillus flavus* szaharázának pH-optimuma 5,0 körül, a *Penicillium glaucum* pedig 4,5—6,0 között van. Előfordulhat, hogy a pH-optimumokat a hőmérséklet is eltolhatja, amivel a trágyánál is számolnunk kell.

Az I. ábra friss lótrágya nádcukorbontó enzimaktivitásának görbét mutatja 5-től 8-ig emelkedő pH értékek mellett három különböző hőmérsékleten vizsgálva. Eszerint a legnagyobb aktivitás az erjedés kezdetén 5,5 pH-nál mutatkozott.

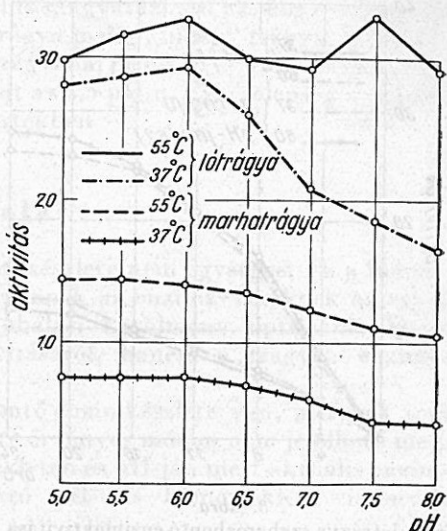
A hőfok emelkedésével az aktivitás csökkenése az emelkedő pH értékekre vonatkoztatva fordított arányban áll, azaz magasabb hőfokon (55 C°) és lúgosabb pH mellett kisebb az aktivitás csökkenése, mint alacsonyabb hőfokon (25 C°). A hőmérséklet-változás tehát befolyásolhatja az enzimaktivitás és a pH közötti összefüggés értékeit.

Érett, légszáraz ló- és marhatrágyával végzett vizsgálatok eredményeit a 2. ábra mutatja. A lótrágya enzim aktivitása 37 C°-on egy, (pH 6,0) 55 C°-on két (pH 6,0 és 7,5) maximumot mutat. Ezenkívül az enzim aktivitás a magasabb hőfo-



1. ábra

Friss lótrágya szacharozbontó enzimaktivitása pH 5,0–8,0 között, 25, 37 és 55 C°-on



2. ábra

Érett ló- és marhatrágya enzimaktivitása pH 5,0–8,0 között, 25 és 55 C°-on

kon lényegesen nagyobb, mint az alacsonyabbon volt. A marhatrágyánál mindkét hőmérsékleten egy-egy maximum (pH 5,0–5,5) látható, bár az aktivitás általában itt is magasabb 55 C°-on, mint 37 C°-on. Ezekből az eredményekből úgy látszik, hogy a vizsgált marhatrágyában működő nádcukorbontó enzim pH-optimuma 5,5 körül van. A vizsgált lótrágyában nyilvánvalóan két enzimmel van dolgunk. Az egyik pH-optimuma 6,0, a másiké pedig 7,5. Hogy ezek izodinamiás enzimek-e (különböző eredetű invertáz), vagy különböző enzimek (pl. maltáz és invertáz), azt ezekből a vizsgálatokból eldönteni nem lehet. Érdekes, hogy a 7,5 optimális pH-jú enzim csak a magasabb hőfokon tevékenykedik. A nádcukorbontás itt is általában 55 C°-on szignifikánsan fokozottabb, mint az alacsonyabb hőfokon.

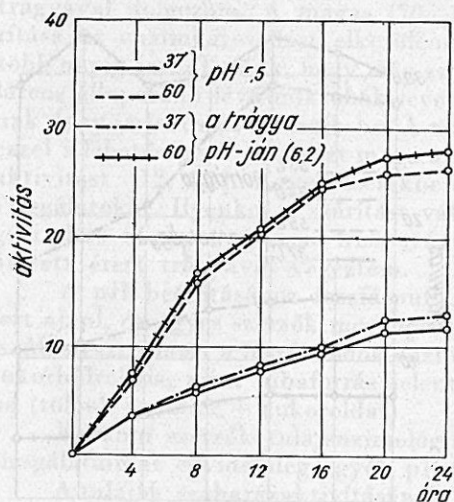
A hőmérséklet hatása az enzimaktivitásra

A hőmérsékleti koefficiens az invertáz esetében a Q_{10} (25 és 35 C° között) = 1,61, az élesztőmaltáz esetében 1,90. Az enzimaktivitás hőmérsékletemelkedésre történő fokozódásáról Lindstål [19] közli, hogy a 60 percen keresztül 56 C°-on tartott szacharózoldat aktivitása mintegy 50%-kal emelkedett.

A 3. ábrán a trágya nádcukorbontó enzimaktivitása és a hőmérséklet közötti összefüggés látható. A vizsgálatokat érett, légszáraz lótrágyával végeztem 5,5 pH-n,

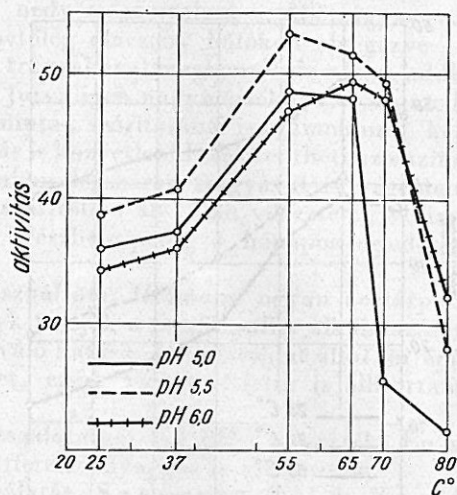
valamint 6,2 pH-n (a trágya saját pH-ja) 37 és 60 C°-on. Az ábrából kitűnik, hogy a 60 C°-on inkubált érett trágya enzimaktivitása lényegesen magasabb a 37 C°-on inkubálténál. Ez a különbség az inkubálási idő folyamán arányosan növekszik. Az aktivitás a trágya saját pH-ján mindvégig valamivel magasabb, mint az 5,5 pH-n.

Ebben az esetben hőinaktiválódásról semmi esetre sem beszélhetünk. Az utolsó 4—8 órában az aktivitásemelkedés fokozatos megszűnésének oka valószínűleg nem a hőinaktiválódás, hanem előfordulhat, hogy a képződött bomlástermékek az enzim



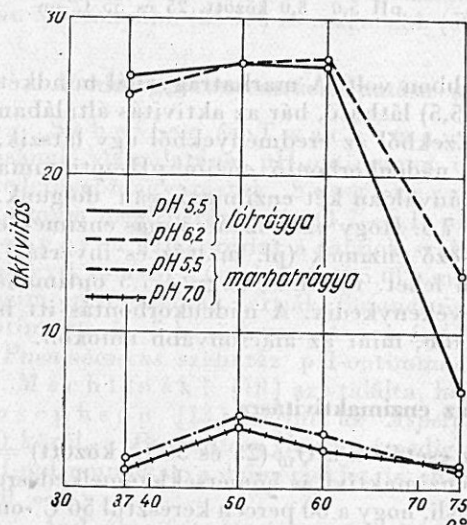
3. ábra

Érett lótrágya szaharozbontó enzimaktivitása különböző pH-n, 37 és 60 C°-on, 24 órán keresztül 4 óránként vizsgálva



4. ábra

Friss lótrágya enzimaktivitása 25–80 C°-on, 3 különböző pH-n



5. ábra

Érett ló- és marhatrágya enzimaktivitása 37–75 C°-on és különböző pH-n

aktivitását befolyásolják. Ismert tény, hogy a szaharáz működését fruktoz jelenléte versengő gátlással határozottan fékezi. Az inkubálás utolsó 8 órájában már elég tekintélyes mennyiségű monoszaharid (glukoz és fruktoz) képződhetett az enzim hatására a nádcukorból ahhoz, hogy feltételezhessük az ilyen típusú gátlás felleptét. Az ok lehet ezenfelül még egyszerűen a tömeghatás törvénye is, mivel a reakciótermékek felhalmozódása a reakció lelassulását okozza.

Friss lótrágyával végzett enzimaktivitási vizsgálatok eredményét mutatja a 4. ábra, különböző hőfokokon (25–80 C°) és három különböző pH-értéken (5,0–5,5–6,0) mérve. Az aktivitás mindhárom pH-értéken körülbelül egyformán emelkedik 55 C°-ig. Az 5,0 és 5,5 pH-nál itt mutatja a maximumot.

Természetesen lehetséges, hogy az 55 C° és a következő mért érték, 65 C° között van a maximum. Az előző ábrán feltüntetett eredmények mindenesetre azt mutatják, hogy az enzim még 60 C°-on sem károsodik. Erre lehet következtetni abból is, hogy a legkevésbé savanyú (6,0) pH-n vizsgált anyag maximuma 65 C°-on van. Érdekes, hogy az enzim aktivitás csökkenése 65—80 C° között a legnagyobb a legsavanyúbb pH-jú anyagnál (5,0), a legkisebb a legkevésbé savanyúnál (6,0). Úgy látszik, hogy a pH is hatással van az enzim hőtűrésére és az inaktíválódás mértékére.

Az érett, légszáraz ló- és marhatrágya enzimaktivitásának vizsgálata (5. ábra) azt mutatja, hogy a vizsgált lótrágya enzimaktivitása lényegesen magasabb, mint a marhatrágyáé. Többek között nyilván ezzel is magyarázható az, hogy a lótrágya régi tapasztalatok szerint „heves”, a marhatrágya pedig „hideg” trágya. A hőmérsékleti optimum a lótrágyánál 60 C°, a marhatrágyánál pedig 50 C° volt. Az inaktíválódás a lótrágya saját pH-ján (6,2) kisebb, mint az 5,5 pH-n. Ez a jelenség a marhatrágyánál is mutatkozik, de jóval kisebb mértékben.

Összefoglalás

1. Az istállótrágya szaharozbontó enzimekészlete nem egységes. Ez a heterogén összetételű mikroflórával magyarázható. Ennek az enzimekeveréknek az egyes tagjai számára esetenként más és más inkubálási körülmény optimális. Ezért nem beszélhetünk a trágyák szaharazaktivitásáról, hanem a trágyák enzimes szaharozbontásáról.

2. Az istállótrágyának olyan szaharozbontó enzimekészlete van, melynek sem pH, sem hőmérsékleti optimuma minden esetre érvényes módon nem jelölhető meg. Meg kell különböztetni a trágya saját hőmérsékletén és pH-ján mért aktuális enzimaktivitást és a legnagyobb aktivitást mutató pH- és hőmérsékleti viszonyok között mért potenciális enzimaktivitást.

3. A szaharozbontó enzimaktivitás különösen az erjedt trágyában magasabb hőfokon (50—60 C°) nagyobb, mint alacsonyabb hőfokon.

4. Az érett trágya szaharozbontó enzimekészlete 60 C°-on inkubálva még viszonylag hosszú időn keresztül sem inaktíválódik, ami arra mutat, hogy ezek az enzimek termotoleránsak és főleg a termofil mikroflóra tevékenysége folytán képződtek.

5. A közeg reakciója az inaktíválódást is befolyásolja, amennyiben kevésbé savanyú közegben a hőinaktíválódás kisebb mértékű, mint savanyúbban.

6. Az enzimek aktivitásának optimális viszonyai erősen függenek a környezet körülményeitől, melyek között eredetileg kialakultak és hatottak.

Érkezett: 1956. október 4.

Irodalom

- [1] Barta, Gy.: Enzimek. Élelmiszeripari Kiadó. Budapest. 1954.
- [2] Drobnik, J. & Seifert, J.: Ceskoslov. Biologie. I. 30. 1955.
- [3] Euler, H.: Chemie d. Enzyme. München. 1928.
- [4] Fermi, C.: Zbl. f. Bakt., II. Abt. 26. 330. 1910.
- [5] Gale, E. & Epps, H.: Biochem. J. 36. 600. 1942.
- [6] Hofmann, E.: Z. Pflernähr. Düng. 56. 68. 1952.
- [7] Hofmann, E. & Hoffmann, G.: Z. Pflernähr. Düng. 70. 9. 1955.
- [8] Hofmann, E. & Latzko, E.: Biochem. Z. 320. 269. 1950.
- [9] Hofmann, E. & Seegerer, A.: Biochem. Z. 321. 97. 1950.
- [10] Hofmann, E. & Seegerer, A.: Biochem. Z. 322. 174. 1951.

- [11] Hofmann, E. & Seegerer, A.: Naturwiss., **38**. 141. 1951.
- [12] Jackmann, R. & Black, C.: Soil Sci. **73**. 167. 1952.
- [13] Josephson N.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **138**. 144. 1924.
- [14] Kroll, L.: Agrokémia és Talajtan. **2**. 301. 1953.
- [15] Kroll, L. & Krámer, M.: Naturwiss. **42**. 157. 1955.
- [16] Kroll, L., Krámer, M. & Lőrincz, E.: Agrokémia és Talajtan. **4**. 173. 1955.
- [17] Kuprevics, V.: Dokl. Akad. Nauk. SSSR. **79**. 863. 1951.
- [18] Leibowitz & Mechlini: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **154**. 64. 1926.
- [19] Lindstål, K.: Svensk. kemisk Tidskrift., **37**. 18. 1925.
- [20] Márkus, L.-né: Agrokémia és Talajtan. **4**. 207. 1955.
- [21] Mastakov, Sz., Kulakovszkaja, T. & Goldina, Sz.: Dokl. Akad. Nauk. SSSR. **98**. 1. 1954.
- [22] Scheffer, F. & Twachtmann, R.: Z. PflErnähr. Düng. **62**. 158. 1953.
- [23] Seegerer, A.: Z. PflErnähr. Düng. **61**. 251. 1953.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ САХАРОЗЫ НАВОЗА

Я. Солноки

Лаборатория почвенной микробиологии Академии Наук Венгрии г. Шопрон

Резюме

Для познания биологических и биохимических процессов, происходящих в отдельных биотипах (в почве, навозе) ценную помощь дают исследования по энзиматической активности. В навозе до сих пор проводили относительно мало энзимологических наблюдений хотя важность данного вопроса требует более подробного изучения. В навозе поселяется очень много микроорганизмов, и в ходе разложения за короткий промежуток времени наблюдаются значительные химические и физические изменения, которые влияют на образование и влияние энзимов. Для исследования энзиматической активности навоза оказалось пригодным изучение энзиматического расщепления сахарозы, т. к. очень много сапрофитных микроорганизмов имеет энзим, расщепляющий сахарозу, кроме этого этот энзим довольно устойчивый и активность его можно легко измерить в комплексных исследуемых веществах.

Исследования проводились на конском и коровьем навозе различной степени разложения. Энзиматическую активность определили при различных pH и температурах с целью изучения влияния этих факторов на энзиматическую активность.

Набор энзимов, расщепляющих сахарозу в навозе не является однородным, хорошо дефинирующим и гомогенным. Это объясняется гетерогенным составом микрофлоры. Предполагается, что здесь действуют не только инвертазы различного происхождения, но и различные энзимы, расщепляющие тростниковый сахар (инвертаза и мальтоза). Для отдельных составляющих этого набора энзимов в отдельных случаях оптимальными являются различные условия инкубации. Поэтому в случае навоза не можем говорить об активности сахарозы, а только об энзиматическом расщеплении сахарозы.

Навоз имеет такой набор энзимов, расщепляющих сахарозу, который не располагает во всех случаях одинаковым оптимумом ни pH, ни температуры. Поэтому необходимо различать актуальную энзиматическую активность при собственном pH и температуре навоза, от потенциальной энзиматической активности при оптимальных условиях pH и температуры.

Энзиматическую активность по расщеплению сахарозы в навозе, особенно в разлагающемся навозе при высокой температуре (50—60°C) выше, чем при низкой температуре (37°C). Набор энзимов навоза, расщепляющих сахарозу при инкубации, при 60°C не инaktivизируется в течение даже сравнительно длительного времени, это показывает, что эти энзимы являются термолатерантными и образуются главным образом в результате деятельности термофильных микроорганизмов.

Реакция среды обуславливает инактивизацию, т. к. в слабо кислой среде инактивизация под влиянием температуры меньше, чем в кислой среде.

Оптимальные условия активности энзима сильно зависят от обстоятельств среды. Изучение влияния энзимов без учёта условий их образования и фактической деятельности было бы иллюзионным. Не только энзим действует на среду, в которой разрушает некоторые вещества или синтезирует другие, но и среда имеет влияние на жизнедеятельность микроорганизма, вырабатывающего энзим, и таким образом влияет на образование и деятельность самого энзима.

На рисунке 1. показывается энзиматическая активность по расщеплению тростникового сахара конского навоза при pH 5—8, и при трёх различных температурах.

На рисунке 2. показываются кривые энзиматической активности конского и коровьего навоза, разлагавшегося в течение 4 месяцев при различных pH и температурах.

На рисунке 3. показывается результат исследования инактивизации набора энзимов, расщепляющих тростниковый сахар навоза под влиянием температуры. Инкубация исследуемого материала проводилась при 37°C и при 60°C и энзиматическую активность изучали в каждые 4 часа в течение 24* часов.

На рисунке 4. показываются кривые энзиматической активности свежего конского навоза. Измерение активности проводилось при трёх различных температурах и pH.

На рисунке 5. изображены кривые энзиматической активности перепревшего конского и коровьего навоза при различных pH и температурах.

Untersuchung des enzymatischen Saccharosabbaus im Stallmist I. Wirkung des pH-Wertes und der Temperatur auf die Enzymaktivität

J. SZOLNOKI

Forschungslaboratorium für Bodenbiologie der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Sopron (Ungarn)

Zusammenfassung

Untersuchungen über Enzymaktivität liefern wertvolle Angaben zur Erkenntnis der in den einzelnen Biotopen (wie Böden, Dünger) sich vollziehenden biologischen und biochemischen Prozessen. Bisher wurden verhältnismässig wenig enzymologische Untersuchungen mit Stallmist durchgeführt, obwohl die Wichtigkeit dieses Problems eine eingehendere Erforschung benötigte. Im Stallmist sind bekanntlich sehr viele Mikroorganismen tätig, und verursachen während der Fermentation in einer kurzen Zeit verschiedene sowohl von chemischen wie auch von physischem Gesichtspunkt wichtige Veränderungen, die auch die Bildung und Wirkung der Enzyme beeinflussen. Für die Untersuchung der Enzymaktivität des Stallmistes zeigte sich das Studium des enzymatischen Abbaus von Saccharose besonders geeignet, weil teils sehr viele saprophyten Mikroorganismen über Saccharose abbauende Enzyme verfügen, teils dieses Enzym ziemlich stabil ist, daher seine Aktivität auch in komplexen Untersuchungsmaterialien einfach und leicht messbar ist.

Die Untersuchungen wurden mit in verschiedenem Masse fermentierten Pferdenmist bzw. Viehmist durchgeführt. Die enzymatischen Aktivitäten wurden bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen gemessen, um die Wirkung dieser Faktoren auf die Enzymaktivität kennen zu lernen.

Der die Saccharose abbauende Enzymvorrat des Stallmistes besteht keineswegs aus einheitlichen, gut definierbaren, homogenen Enzymen, was mit einer Mikroflora heterogener Zusammensetzung erklärbar sei. Es ist wahrscheinlich, dass nicht nur Invertasetypen verschiedener Ursprung, sondern auch verschiedene saccharose-abbauende Enzyme (wie Invertase und Maltase) in diesen Prozessen teilnehmen. Für die einzelnen Komponenten dieses Enzymgemisches sind gegebenenfalls andere Inkubationsbedingungen die optimalen. Daher soll man im Falle vom Stallmist statt Saccharasaktivität nur einen enzymatischen Saccharasabbau erwähnen.

Der Vorrat an Saccharose abbauenden Enzymen ist im Stallmist solcher Natur, dass weder ein optimaler pH-Wert, noch eine optimale Temperatur angegeben werden kann. Statt deren soll man die tatsächliche — bei der natürlichen Temperatur und pH-Wert des Mistes gemessene — Enzymaktivität, und die potenzielle — bei den optimalen pH-Wert und Temperatur gemessene — Enzymaktivität bestimmen.

Die Aktivität der Saccharose abbauenden Enzymen ist im Stallmist, besonders im fermentierenden Mist bei einer höheren Temperatur (50–60° C) höher, als bei einer niedrigeren (37° C.). Der Vorrat an Saccharose abbauenden Enzymen wird im Stallmist eben bei einer längeren Inkubation bei 60° C nicht inaktiviert. Dies zeigt die Thermostabilität dieser Enzyme an, die hauptsächlich durch die Tätigkeit der thermophilen Mikroflora entstanden sind.

Die Inaktivierung wird auch durch die Reaktion des Mediums beeinflusst, indem die durch Wärmebehandlung hervorgerufene Inaktivierung in einem schwach saurem Medium schwächer war, als in einem stärker saurem.

Die optimalen Bedingungen der Enzymaktivität sind von den Umständen des Mediums stark abhängig. Die Erforschung dieser Wirkungen wäre ganz illusorisch ohne Rücksichtnahme der Ausbildung und aktuellen Tätigkeit der Enzyme. Es wirkt nämlich nicht nur das Enzym auf das Medium, indem gewisse Substanzen abgebaut oder aufgebaut werden, sondern das Medium beeinflusst auch die Lebenstätigkeit der das Enzym herstellende Mikroorganismen, daher auch die Bildung und Aktivität des Enzyms.

Abb. 1. zeigt die Aktivität des die Saccharose abbauenden Enzyms des frischen Pferdestestes bei von 5 bis 8 erhöhten pH-Werten, gemessen bei drei verschiedenen Temperaturen.

Abb. 2 darstellt die Enzymaktivitätskurven von 4 Monaten lang fermentierten Pferde- und Viehmistes, gemessen bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen.

Abb. 3 zeigt die Untersuchungsergebnisse über die durch Wärmebehandlung hervorriefene Inaktivierung des die Saccharose abbauende Enzymvorrats im Stallmist. Das Untersuchungsmaterial wurde bei 37 bzw. 60° C inkubiert, und die Enzymaktivität in einem Intervall von 24 Stunden jede 4 Stunden gemessen.

Abb. 4 stellt die Enzymaktivitätskurven von frischem Pferdemist dar. Die Aktivität wurde bei verschiedenen Temperaturen und drei verschiedenen pH-Werten gemessen.

Abb. 5. Enzymaktivitätskurven des fermentierten Pferdemistes bzw. Viehmistes, gemessen bei verschiedenen pH-Werten und verschiedenen Temperaturen.